

The impact of long-term NO-deficiency on the vasoactive properties of thoracic aorta, NOS activity, and plasma biomarkers of oxidative stress in young SHR

Vplyv dlhodobého deficitu NO na vazoaktívne odpovede hrudnej aorty, aktivitu NO-syntázy a biomarkery oxidačného stresu u mladých spontánne hypertenzných potkanov

Berényiová A¹, Dovinová I¹, Kvandová M¹, Kristek F¹, Jansen E², Majzúnová M¹, Čáčányiová S¹

¹Centrum experimentálnej medicíny Slovenskej akadémie vied, Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Bratislava, Slovenská republika

Berényiova A, Dovinova I, Kvandova M, Kristek F, Jansen E, Majzunova M, Cacanyiova S. **The impact of long-term NO-deficiency on the vasoactive properties of thoracic aorta, NOS activity, and plasma biomarkers of oxidative stress in young SHR.** *Cardiology Lett.* 2020;29(5–6):303–309

Abstract. *Aim:* In this study we aimed to describe the effect of chronic NO-deficiency on the systolic blood pressure (sBP), the vasoactive responses of thoracic aorta (TA), activity of NO-synthase (NOS) and general biomarkers of oxidative stress in plasma of young spontaneously hypertensive rats (SHR).

Subjects and methods: A non-specific NOS inhibitor, N^o-nitro-L-arginine (L-NAME, 50 mg/kg/day, p.o.) was administered for 4-5 weeks to four-week-old SHR (n = 8), age matched SHRs (n = 8) used as a control group. The sBP was measured by the non-invasive plethysmographic method, weekly. At the end of the treatment plasma samples were collected, the biometric parameters were calculated, and the TA was isolated. The vasoactive responses of TA were followed by sensors of isometric tension. NOS activity was measured by conversion of radioactive L-arginine to L-citruline.

Results: The L-NAME treatment induced a transient sBP increase only and had a moderated inhibitory effect on the endothelium-dependent relaxation of TA. Thereby, the inhibition of NOS activity varied from tissue to tissue, ranging from the lowest in the TA and the kidney to the highest in the brain stem. Despite an increased sensitivity of adrenergic receptors, the maximal adrenergic contraction of TA was unchanged, and also the level of general biomarkers of oxidative stress did not change.

Conclusions: Our findings proved that the TA of young SHR responded to chronic NO deficiency by a development of adaptive mechanisms on the functional (preserved NO-derived vasorelaxation, unincreased contraction) and molecular (preserved NOS activity) levels. Although these mechanisms could provide a local compensation of increased activity of the adrenergic system, they were not able to eliminate changes evoking serious systemic pathological consequences. Fig. 3, Tab. 3, Ref. 23, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Key words: NOS inhibition – young spontaneously hypertensive rats – vasoactivity – compensatory mechanisms

Z ¹Centra experimentálnej medicíny Slovenskej akadémie vied, Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Bratislava, Slovenská republika a ²Centre for Health Protection, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Holandsko

Do redakcie došlo dňa 17. septembra 2020; prijaté dňa 8. decembra 2020

Adresa pre korešpondenciu: Mgr. Andrea Berényiová, PhD., Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Centrum experimentálnej medicíny SAV, Sienkiewiczova 1, 813 71 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: andrea.berenyiova@savba.sk

Berényiová A, Dovinová I, Kvandová M, Kristek F, Jansen E, Majzúnová M, Čáčányiová S. **Vplyv dlhodobého deficitu NO na vazoaktívne odpovede hrudnej aorty, aktivitu NO-syntázy a biomarkery oxidačného stresu u mladých spontánne hypertenzných potkanov.** *Cardiology Lett.* 2020;29(5–6):303–309

Abstrakt. *Cieľ:* Cieľom tejto štúdie bolo popísať efekt chronického deficitu NO u mladých spontánne hypertenzných potkanov (SHR) na systolický tlak krvi (sTK), vazoaktívne odpovede hrudnej aorty (HA), aktivitu NO-syntázy (NOS) a parametre oxidačného stresu v plazme.

Súbor a metodika: Štvortýždňovým samcom SHR bol podávaný nešpecifický inhibitor NOS (L-NAME) 50 mg/kg/deň v pitnej vode (n = 8) počas 4 – 5 týždňov, samce SHR boli použité ako kontrolná skupina (n = 8). Počas podávania sa týždenne meral sTK neinvazívnou pletyzmografickou metódou. Po dekapitácii sa stanovili biometrické parametre, parametre oxidačného stresu v plazme a bola izolovaná HA. Vazoaktívne odpovede HA sme zaznamenávali pomocou snímačov zmien izometrickej tenzie. Aktivita NOS sa sledovala stanovením premeny rádioaktívne značeného L-arginínu na L-citrulín.

Výsledky: Podávanie L-NAME mladým SHR vyvolalo len prechodné zvýšenie sTK a prekvapivo malo mierny inhibičný účinok na vazorelaxáciu HA závislú od endotelu. Zároveň sa potvrdila tkanivovo špecifická heterogenita inhibície aktivity NOS. Napriek zvýšenej citlivosti adrenergických receptorov na exogénny noradrenalin maximum kontraktilnej odpovede sa nezmenilo, podobne sme nezaznamenali zmeny v biomarkeroch oxidačného stresu v plazme.

Záver: Naše nálezy naznačujú, že v prehypertenznom období SHR disponuje cievná stena HA adaptačnými mechanizmami. Aj napriek dlhodobej inhibícii NOS je schopná produkovať biologicky aktívny NO, ktorý zabezpečí síce lokálnu kompenzáciu zvýšenej aktivity adrenergického systému, ale nedokáže eliminovať systémové patologické procesy, ktoré vedú k malígnym následkom. Obr. 3, Tab. 3, Lit. 23, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Kľúčové slová: inhibícia NOS – mladé spontánne hypertenzné potkany – vazoaktivita – kompenzačné mechanizmy

Každá z izoformiem NO-syntázy (NOS) má potenciál zmeniť krvný tlak. V endotelových bunkách cievej steny zabezpečujú premenu L-arginínu na L-citrulín rôzne izoformy NOS, medzi produktom tejto reakcie je primárna vazorelaxačná molekula, oxid dusnatý (NO). Inhibíciu aktivity NOS môže sprostredkovať mnoho chemických látok, medzi najznámejšie NOS inhibítory patria analógy L-arginínu, napríklad N^G-nitro-L-arginín-metyléster (L-NAME). Dlhodobá aplikácia týchto inhibítorov indukuje trvalé zvýšenie krvného tlaku, často spojené so zvýšenou vazokonstrikciou a oxidačným stresom, poruchou endotelovej funkcie a štrukturálnou prestavbou steny srdca a ciev u normotenzných potkanov (1).

Podobné funkčné a štrukturálne zmeny sme pozorovali aj u spontánne hypertenzných potkanov (SHR), modelu ľudskej esenciálnej hypertenzie. Presné mechanizmy vzniku a rozvoja hypertenzie u SHR zatiaľ známe nie sú. Veľmi skoro po zistení výrazných vazorelaxačných a antiproliferačných vlastností NO vystala otázka, či defekt v produkcii NO nie je zodpovedný za fyziologické a morfológické zmeny v kardiovaskulárnom systéme u rôznych typoch hypertenzie. Literárne zdroje však uvádzajú rozporuplné výsledky týkajúce sa tejto otázky. Niektoré vedecké skupiny dokázali zvýšenú tvorbu NO u SHR (2) a zväčšenú od endotelu závislú vazorelaxáciu (3, 4). Papapetropoulos et al. (5) zistili v karotickej artérii SHR zvýšené hodnoty cGMP, dôležitého mediátora relaxácie závislej od NO, v porovnaní s kontrolnými potkanmi. Zároveň naše predchádzajúce experimenty potvrdili síce zvýšenie

aktivitu NOS u dospelých SHR, ale vazorelaxačné účinky NO sa neprejavili v dostatočnej miere, keďže sme zaznamenali redukované relaxačné schopnosti HA (6). Niektoré vedecké štúdie predpokladajú, že endotelová dysfunkcia u SHR súvisí so zvýšenou produkciou voľných radikálov, ktoré vychytávajú endogénne produkovaný NO a takto znižujú jeho biologickú dostupnosť (7).

Odpoveď na otázku, akú úlohu má NO signalizácia v etiopatogenéze esenciálnej hypertenzie by mohli poskytnúť aj chronické experimenty, v ktorých je dlhodobo inhibovaná endogénna produkcia tejto molekuly. Aby bolo možné odhaľovať príčinu vzniku a spustenia patologických procesov, je nevyhnutné spoznávať základné mechanizmy fungovania signálnych dráh najmä v niektorých kritických vymedzených obdobiach skorej ontogenézy (tzv. developmental windows), kedy prebieha funkčná špecifikácia kardiovaskulárnych funkcií (8). Cieľom tejto štúdie preto bolo popísať efekt chronickej inhibície NOS u mladých SHR na krvný tlak a vazoaktívne odpovede HA, NOS aktivitu a parametre oxidačného stresu.

Materiál a metódy

Experimentálne zvieratá

Experimenty na zvieratách sa uskutočnili v súlade s predpismi Štátnej veterinárnej a potravinovej správy SR a Etickej komisie Ústavu normálnej a patologickej fyziológie

Centra experimentálnej medicíny Slovenskej akadémie vied (ÚNPF CEM SAV) (EK/noh2s/14). Zvieratá boli chované v akreditovanom chovnom zariadení ÚNPF CEM SAV v podmienkach striedajúcich cyklov 12 hodín svetlo – 12 hodín tma, pri konštantnej teplote (20 – 22 °C) a vlhkosti (45 – 65 %), štandardné krmivo im bolo poskytnuté ad libidum. ÚNPF CEM SAV zabezpečoval ich kompletnú veterinárnu kontrolu.

V experimente sa štvortýždňovým samcom SHR podával nešpecifický inhibítor NOS (L-NAME) 50 mg/kg/deň v pitnej vode (SHR+L-NAME; n = 8) počas 4 – 5 týždňov, rovnako staré samce SHR sa použili ako kontrolná skupina (SHR; n = 8). Počas podávania sa týždenne meral sTK neinvazívnou pletyzmografickou metódou na chvostovej artérii zvierat. V štvrtom týždni podávania L-NAME sme zaznamenali náhle zhoršenie zdravotného stavu experimentálnych zvierat: strata koordinácie, ochrnutie dolných končatín, výrazný úbytok hmotnosti až následný úhyn zvierat. Preto zvyšok zvierat v tejto skupine sme monitorovali denne a po objavení akýchkoľvek hore uvedených symptómov boli zvieratá ľudsky usmrtené dekapitáciou po krátkej CO₂ anestézii. Následne bola odobratá trunkálna krv na stanovovanie parametrov oxidačného stresu v plazme, vybrané orgány sa izolovali na stanovovanie základných biometrických parametrov a meranie aktivity NOS, zároveň sa HA izolovala pre in vitro funkčné štúdie. Základné biometrické parametre: relatívna hmotnosť srdca a obličky, dĺžka tibia boli vyjadrené ako pomer hmotnosti orgánu a hmotnosti tela, respektíve hmotnosti orgánu a dĺžky tibia.

Funkčné in vitro štúdie

Hrudná aorta zvierat sa odobrala a očistila od okolitého tkaniva a nakrájala na prstence (5 mm dĺžky). Cievné preparáty boli vertikálne zašixované na trojuholníky z nehrdzavejúcej ocele a ponorené do 20 ml orgánovej vaničky obsahujúcej Krebsov roztok (118 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 2,5 mM CaCl₂, 11 mM glukóza, 0,032 mM CaNa₂EDTA) a inkubované pri teplote 37 °C. Roztok bol prekysličený zmesou O₂ (95 %) a CO₂ (5 %). Horný trojuholník bol spojený s eletromechanickým snímačom (MDE, Maďarsko), zmeny izometrickej tenzie boli zaznamenané pomocou AD prevodníka a programom Dewetron software. Pri každom prstenci sa použilo predpätie 1 g. Následne sa preparáty ušľachovali 60 – 90 minút až do dosiahnutia ustálenej tenzie. Funkčnosť endotelu sme zisťovali podávaním stúpajúcich dávok acetylcholínu (10⁻¹⁰ – 10⁻⁵ mmol/l) na noradrenalinom predkontrahovanej cieve (10⁻¹⁰ – 10⁻⁵ mmol/l). Keďže aj napriek dlhodobej inhibícii NOS bola zaznamenaná značná vazorelaxácia na acetylcholíne, akútne sa použil L-NAME (10⁻⁴ mmol/l) 20 minút pred opakovaným podaním noradrenalinu a acetylcholínu. Kontraktilné odpovede boli vyjadrené ako absolútna veľkosť zmeny tenzie v gramoch

a relatívne – ako percentuálny podiel z maximálnej odpovede noradrenalinu. Z jednotlivých kriviek sa vypočítali tak parameter citlivosti receptorov na podanú látku, ako aj hodnoty EC₅₀ vyjadrujúce koncentráciu látky, ktorá vyvolala 50 %-nú odpoveď. Veľkosť relaxačných odpovedí bola vyjadrená ako percento úbytku noradrenalinovej kontrakcie. Z jednotlivých relaxačných kriviek pre acetylcholíne sa vypočítala aj hodnota IC₅₀, koncentrácia vyvolávajúca 50 %-nú odpoveď.

Meranie aktivity NO-syntázy

Aktivita NOS sa sledovala stanovením premeny rádioaktívne značeného [3H]-L-arginínu na [3H]-L-citrulín. Na stanovenie NOS aktivity boli pripravené 20 % tkanivové homogenáty s Tris-HCl inhibítorom proteáz. Homogenáty sa scentrifugovali 10 min pri 5000 rpm a 4 °C. Potom sa 6 minút pri 37 °C inkubovali s reakčnou zmesou (0,5 M Tris pH 7,4; 10 mmol/l NADPH; 20 mmol/l CaCl₂ a MgCl₂; 100 μmol/l L-arginín; 1 mg/ml kalmodulín; 1 : 1 FAD/FMN; rádioaktívne označený L-arginín; 50 mmol/l BH₄; destilovaná voda). Po 20 minútach bola reakcia pozastavená podaním 1 mmol/l L-citrulínu v zmesi HEPES (0,02 mmol/l), EDTA (2 mmol/l) a EGTA (2 mmol/l). Následne sa aplikoval 1 ml zmesi na kolóny Dowex v Na⁺ cykle a po pridaní scintilačnej kvapaliny a kolóny premyli 1,5 ml destilovanej vody. Vzorky sa odmerali na tríciovom kanáli (Tri-Carb 2910 TR, PerkinElmer). Aktivita NOS bola vyjadrená ako picokatal na g proteínu.

Stanovenie biomarkerov oxidačného stresu v plazme

Analýza metabolitov reaktívnych foriem kyslíka (ROM) je spektrofotometrická metóda na stanovenie koncentrácie peroxidu vodíka. Peroxid vodíka v plazme reaguje s chromogénnym substrátom za vzniku farebného derivátu (dROM assay, Diacron International, Italy). Na stanovenie biologického antioxidantného potenciálu (BAP) plazmy sa používa metóda založená na redukcii farebného roztoku obsahujúceho železité ióny antioxidantmi v plazme (BAP assay, Diacron International, Italy). Metóda stanovenia celkovej koncentrácie tiolových zlúčenín (total thiol levels, TTL) je založená na schopnosti voľných tiolových skupín vytvoriť farebný komplex pri reakcii 5,5'-DiTibis (kyselina 2-nitrobenzoová) (Gaziatep, Turkey). Všetky parametre v plazme sa stanovili pomocou UniCel DxС 800 klinického analyzátoru (Bechman-Coulter, Netherlands).

Štatistická analýza

Hodnoty boli vyjadrované ako priemerná hodnota ± S.E.M. Štatistická významnosť medzi jednotlivými skupinami sa hodnotila jednofaktorovou analýzou variácie (ANOVA) a následne Bonferroniho post-hoc testom a párovým Student's t-testom. Rozdiely medzi priemermi sa považovali za štatisticky významné na hladine významnosti p < 0,05.

Tabuľka 1 Zmena systolického tlaku krvi počas NOS inhibície

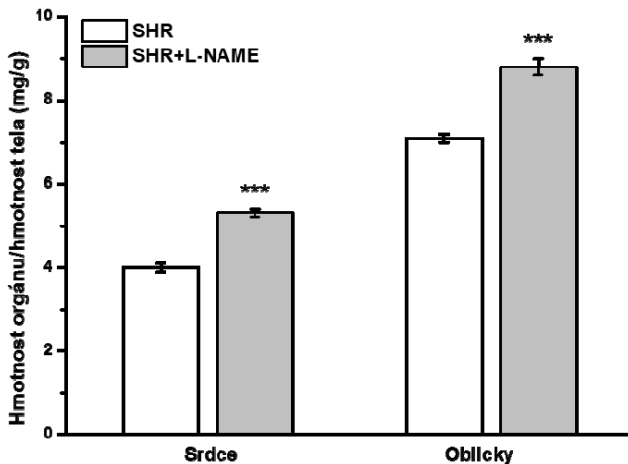
Skupina	n	sTK (mm Hg) 0. týždeň	sTK (mm Hg) 1. týždeň	sTK (mm Hg) 2. týždeň	sTK (mm Hg) 3. týždeň	sTK (mm Hg) 4. týždeň
SHR	8	106,3 ± 1,9	113,4 ± 1,9	129,6 ± 2,9	137,8 ± 1,7	154,4 ± 3,8
SHR+L-NAME	8	108,1 ± 2,6	106,6 ± 1,6*	135,2 ± 3,6	150,6 ± 2,5***	152,1 ± 3,9

Výsledky

Systolický krvný tlak a základné biometrické parametre

Zmeny hodnoty sTK sme monitorovali týždenne počas podávania L-NAME. Po prvom týždni podávania bol síce sTK významne nižší u SHR+L-NAME skupiny, avšak v treťom týždni sme pozorovali významné zvýšenie sTKu tejto skupiny,

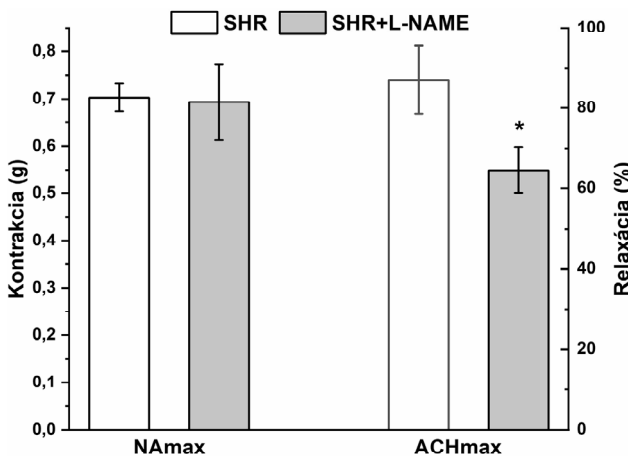
na konci podávania L-NAME sme nezaznamenali rozdiely v hodnotách sTK (**tabuľka 1**) medzi experimentálnymi skupinami. Relatívna hmotnosť srdca a obličky bola vyššia v porovnaní s SHR skupinou (**obrázok 1**). Na druhej strane sa neprejavila zmena pomeru hmotnosti srdca k dĺžke tibia, čo je ďalší ukazovateľ zmeny troficity srdca.



Obrázok 1 Relatívna hmotnosť srdca a obličky ako parameter troficity orgánov

Vazoaktívne odpovede hrudnej aorty

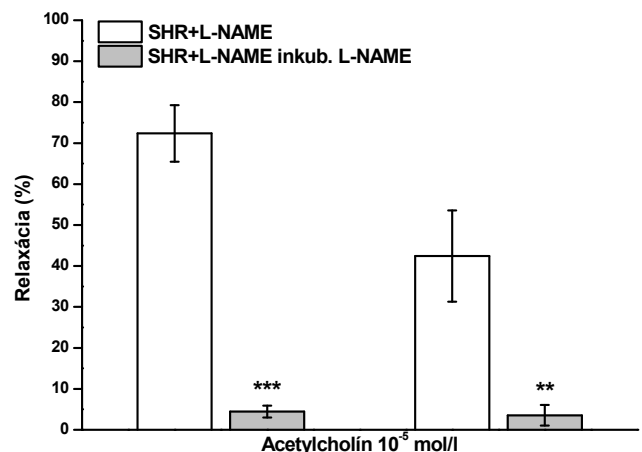
Dlhodobá NOS inhibícia zvýšila citlivosť hladkých svalových buniek na exogénny noradrenalín (EC_{50} SHR: $7,79 \pm 0,06$; EC_{50} SHR + L-NAME: $8,44 \pm 0,17$; $p < 0,01$), ale silu maximálnej kontrakcie nezmenila (**obrázok 2**). Podávanie L-NAME indukovalo len miernu inhibíciu od endotelu závislej vazorelaxácie, ktorá je sprostredkovaná endogénne uvoľneným NO, zároveň zvýšila citlivosť muskarínových receptorov na acetylcholín (IC_{50} SHR: $7,05 \pm 0,29$; IC_{50} SHR + L-NAME: $7,91 \pm 0,39$; $p < 0,05$) (**obrázok 2**). Akútna inkubácia preparátov HA s L-NAME (20 min, 10^{-4} mol/l) významne inhibovala acetylcholínom vyvolanú vazorelaxačnú odpoveď aj u SHR aj u SHR + L-NAME skupiny (**obrázok 3**).



Obrázok 2 Základné vazaktívne odpovede hrudnej aorty

Aktivita NO-syntázy a biomarkery oxidačného stresu v plazme

Chronické podávanie L-NAME signifikantne redukovalo aktivitu NOS vo všetkých vybraných orgánoch (**tabuľka 2**).



Obrázok 3 Vplyv akútnej inhibície NO-syntázy na relaxačnú odpoveď hrudnej aorty

Tabuľka 2 Aktivita NO-syntázy vo vybraných orgánoch

	SHR (pmol/min/mg proteín)	SHR+L-NAME (pmol/min/mg proteín)
Pravá komora	0,3984 ± 0,01218	0,09229 ± 0,00757***
Ľavá komora	0,3924 ± 0,02488	0,08666 ± 0,00567***
Hrudná aorta	0,93 ± 0,0537	0,6007 ± 0,01869***
Mozgový kmeň	1,35 ± 0,06199	0,1859 ± 0,01034***
Kóra obličiek	0,1383 ± 0,00235	0,09461 ± 0,00461***

Avšak sa potvrdila tkanivovo špecifická heterogenita inhibície aktivity NOS: najvýraznejšie sa prejavila v mozgovom kmeni, menej výrazne v HA a obličkách. Na druhej strane, dlhodobá inhibícia NOS nemala vplyv na biomarkery oxidačného stresu (ROM, BAP, TTL) stanovené v plazme zvierat (**tabuľka 3**).

Diskusia

Dlhodobo zvýšený tlak krvi sa u SHR rozvíja postupne. Po prvej prehypertenznej fáze (3. – 5. týždeň života), kedy sa hodnoty krvného tlaku ešte neodlišujú od hodnôt nameraných u normotenzných potkanov, nastupuje rýchly nárast krvného tlaku, ktorý sa stabilizuje približne v 20. týždni veku zvierat. Štvrtý týždeň ontogenézy tohto kmeňa je preto vysoko vnímavý na patologické zmeny rozhodujúce pre ďalší vývoj hypertenzie (8). V našom experimente vyvolalo podávanie L-NAME mladým SHR sice zvýšenie krvného tlaku, ale až v 3. týždni (**tabuľka 1**) experimentu. V 4. týždni podávania L-NAME sme nepozorovali rozdiely v tlaku krvi, avšak sme zaznamenali zhoršenie zdravotného stavu zvierat (stratu koordinácie, ochrnutie dolných končatín, výrazný úbytok hmotnosti) a následný úhyn zvierat. Podobné následky pozorovali po podávaní L-NAME dospelým SHR aj Ono et al. (9) a Benter et al. (10), kde však bol zaznamenaný jednoznačný nárast tlaku krvi. V týchto štúdiách vyvolalo 2- až 4-týždňové chronické podávanie L-NAME u SHR malígnu formu hypertenzie často aj s fatálnymi následkami. Autori zaznamenali prudký pokles hmotnosti tela a orgánové malformácie (ateroskleróza, nefroskleróza, fibróza srdca) často končiacie smrťou, ktorej príčina súvisela s početnými infarktmi myokardu a mozgovými cievny príhodami. Treba pripomenúť, že pozorované chorobné stavy pravdepodobne indukovali stres u experimentálnych zvierat. Imobilita v dôsledku paralýzy končatín môže znamenať významný stresor ovplyvňujúci redoxný status s možným dopadom na cievnu reaktivitu. Počas našich experimentov sme u mladých SHR zistili významne zníženú hmotnosť tela po chronickom podávaní L-NAME (údaje nie sú uvedené). Naopak, relatívna hmotnosť srdca a obličky bola vyššia v porovnaní s kontrolnou skupinou (**obrázok 1**). Na druhej

Tabuľka 3 Biomarkery oxidačného stresu v plazme

Skupina	ROM UI/l	TTL (μ mol/l)	BAP meq/l
SHR	297 ± 5	323 ± 15	2 619 ± 37
SHR+L-NAME	314 ± 27	278 ± 18	2 708 ± 130

strane nebola pozorovaná zmena pomeru hmotnosti srdca k dĺžke tibie, čo je ďalší ukazovateľ zmeny troficity srdca. Pozorovaná hypertrofia myokardu a renálneho tkaniva je teda pravdepodobne skreslená nižšou hmotnosťou tela, ktorá je charakteristickým znakom SHR (11), a ktorá sa ďalej prehľbovala po podávaní L-NAME.

V tejto štúdii sme sledovali základné vazoaktívne schopnosti HA, t. j. kontraktívnu odpoveď sprostredkovanú aktiváciou adrenergických receptorov (exogénny noradrenalin) a vazorelaxáciu závislú od endotelu, ktorá je priamym ukazovateľom bioaktivity endogénneho NO (exogénny acetylcholin). Dlhodobá NOS inhibícia zvýšila citlivosť hladkých svalových buniek na exogénny noradrenalin, ale zmenu maximálnej sily kontrakcie nevyvolala (**obrázok 2**). Na rozdiel od týchto nálezov naše predchádzajúce výsledky ukázali, že podávanie L-NAME štvortýždňovým Wistar potkanom redukovalo kontraktívnu odpoveď HA na exogénny noradrenalin (12). Oliver et al. (13) vo svojich štúdiách vysvetľujú zníženú kontraktilitu HA po podávaní L-NAME normotenzným zvieratám potlačenou citlivosťou a expresiou α -adrenergických receptorov na membráne hladkých svalových buniek cievnej steny. Zároveň pozorovali vyššiu aktivitu β -adrenergických receptorov sprostredkujúcich relaxáciu cievnej steny. Na druhej strane autori demonštrujú, že mladé prehypertenzné SHR majú zvýšenú expresiu β_1 adrenergických receptorov a počas ontogenézy sa mení pomer a aktivita α a β -adrenergických receptorov. U SHR sa vekom zvyšuje zastúpenie a citlivosť α -adrenergických receptorov, ako aj expresia GRK₂ (proteín kinázy spriahnutej s G-proteínom), ktorá znižuje účinnosť β -receptorov. To vedie k zväčšeniu sympatikového adrenergického tonusu a zvýšenej kontraktilitate ciev na adrenergické stimuly (14). Je pravdepodobné, že po podávaní L-NAME bol nárast citlivosti hladkých svalových buniek na noradrenalin u SHR determinovaný patologickými zmenami na úrovni adrenergických receptorov, ktoré sa rozvíjajú s vekom a ktoré zabránili, aby sa rozvinuli podobné adaptačné mechanizmy ako u normotenzných potkanov.

Podávanie L-NAME indukovalo len miernu inhibíciu od endotelu závislej vazorelaxácie (22,4 % inhibícia) oproti kontrolnej SHR skupine (**obrázok 2**). Aby sme demonštrovali, že pozorovaná reziduálna relaxácia je sprostredkovaná endogénnym NO, akútne sme predradili L-NAME (10^{-4} mol/l). Akútna inkubácia ciev s L-NAME významne inhibovala acetylcholínom vyvolanú vazorelaxačnú odpoveď

(obrázok 3). Výsledky funkčných štúdií súviseli s relatívne zachovalou aktivitou NOS v aorte (len 31,6 % inhibícia). Výsledky funkčných štúdií podporila aj relatívne zachovalá aktivita NOS v aorte (len 31,6 % inhibícia) a nezmenené hodnoty sTK namerané na konci podávania L-NAME. Niektoré štúdie potvrdzujú, že veľké cievy SHR môžu disponovať nezmenenou vazorelaxáciou závislou od endotelu a zvýšenou endogénnou produkciou NO (15). Navyše naše predchádzajúce štúdie potvrdili, že u mladých SHR endogénne NO participuje vo väčšej miere na vazorelaxačných odpovediach ako u mladých normotenzných potkanov (16). Výsledky naznačujú, že u mladých SHR po chronickej inhibícii NOS je prítomné dostatočné množstvo fyziologicky aktívneho NO, ktorý prispieval k zachovaniu vazorelaxačnej odpovede. Zároveň môžeme predpokladať, že u mladých SHR sa mohli spustiť adaptačné mechanizmy, ktoré viedli k tomu, že od endotelu závislá vazorelaxačná odpoveď zostala nezmenená. Ďalšie práce v ostatnom čase potvrdili, že prehypertenzná fáza SHR sa spája so zvýšenou produkciou a aktivitou ADMA, asymetrického L-arginínu, ktorý je endogénnym inhibítorom NOS (17, 18) a práca Cheng et al. (19) potvrdila, že šesť týždňov podávania L-NAME (80 mg/l) týmto zvieratám ešte viac zvyšuje jeho hladinu. V kardiovaskulárnom systéme sa často uplatňuje princíp negatívnej spätnej väzby. Kristek et al. (20) a Dovinová et al. (21) ukázali, že u SHR môže vyvolať zvýšená hladina NO inhibičný efekt na aktivitu NOS. Pecháňová et al. (22) ukázali, že zvýšená expresia eNOS spätnoväzobným mechanizmom vyvoláva pokles jej aktivity v snahe zachovať hladinu NO v kardiovaskulárnom systéme na približne rovnakej úrovni. Ak zoberieme do úvahy, že hladina endogénneho inhibítora NOS (ADMA) môže byť v L-NAME skupine zvýšená, potom jej ďalšia inhibícia podaním exogénneho inhibítora L-NAME môže viesť k podobnej negatívnej spätnej väzbe, zvýšeniu produkcie NO. Práca Al-Zobaidy et al. (23) ukázala, že v hrudnej aorte potkana akútne podanie ADMA síce inhibovalo bazálnu produkciu NO, ale malo malý efekt na stimulované uvoľnenie NO po podaní acetylcholínu (relaxácia zostala zachovaná), okrem toho podanie ADMA (podobne ako L-arginínu) malo protektívny účinok na inhibíciu acetylcholínom vyvolanej vazorelaxácie vyvolanú podaním L-NAME (inhibícia relaxácie bola menšia). Hoci mechanizmus týchto odpovedí autori neodhalili, naše výsledky ho dopĺňajú (zvýšená hladina ADMA by mohla blokovať inhibičný účinok L-NAME na acetylcholínom vyvolanú relaxáciu).

Záver

Naše nálezy naznačujú, že v prehypertenznom období SHR disponuje cievna stena HA adaptačnými mechanizmami. Aj napriek dlhodobej inhibícii NOS je schopná produkovať biologicky aktívny NO, ktorý zabezpečí síce lokálnu

kompenzáciu zvýšenej aktivity adrenergického systému, ale nedokáže eliminovať systémové patologické procesy vedúce k malígnym následkom.

Ďakovanie: Práca bola podporená grantmi: VEGA 2/0111/19, VEGA 2/0103/18, APVV-15-056.

Literatúra

- Bernatova I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? *Biomed Res Int* 2014; Article ID 598271, pp. 14, doi: 10.1155/2014/598271, 2014.
- Wu CC, Yen MH. Higher level of plasma nitric oxide in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1999;12:476-482.
- Mourlon-Légrand MCH, Benessiano J, Levy BI. Local hyperproduction of cGMP in carotid arteries from SHR is endothelium-dependent. In: *Genetic Hypertension, SASSARD J. (ed), Colloque INSERM. Montrouge: John Libbey Eurotext; 1992;218:31-33.*
- Tschudi M, Crisciona L, Novosel D, et al. Antihypertensive therapy augments endothelium-dependent relaxations in coronary arteries of spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 1994;98:2212-2218.
- Papapetropoulos A, Marczin N, Snead MD, et al. Smooth muscle cell responsiveness to nitrovasodilators in hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 1994;23:76-84.
- Berenyiova A, Drobná M, Cebova M, et al. Changes in the vasoactive effects of nitric oxide, hydrogen sulfide and the structure of the rat thoracic aorta: the role of age and essential hypertension. *J Physiol Pharmacol* 2018; doi: 10.26402/jpp.2018.4.05.
- Hai-Yeha A, Nassar T, Lotan Ch, et al. Development of 3-nitratomethyl-proxyl (NMP): A novel, bifunctional superoxide dismutase-mimic-nitric oxide-donor. *Drug Res Rev* 2000;50:528-536.
- Zicha J, Kunes J. The interaction of genetic and environmental factors in the etiology of hypertension. *Physiol Rev* 1999;79:1227-1282.
- Ono H, Ono Y, Frohlich ED. Nitric oxide synthase inhibition in spontaneously hypertensive rats. Systemic, renal, and glomerular hemodynamics. *Hypertension* 1995;26:249-255.
- Benter IF, Yousif MH, Anim JT, et al. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H684-91.
- Cebova M, Kristek F. Age-dependent ultrastructural changes of coronary artery in spontaneously hypertensive rats. *Gen Physiol Biophys* 2011;30:364-372.
- Cacanyiova S, Berenyiova A, Malekova M, et al. Different vasoactive effects of chronic endothelial and neuronal NO-synthase inhibition in young Wistar rats. *J Physiol Biochem* 2014;70:749-760.
- Oliver E, Flacco N, Arce C, et al. Changes in adrenoceptors and G-protein-coupled receptor kinase 2 in L-NAME-induced hypertension compared to spontaneous hypertension in rats. *J Vasc Res* 2014;51:209-220.
- Oliver E, Martí D, Montó F, et al. The impact of alpha1-adrenoceptors up-regulation accompanied by the impairment of

- beta-adrenergic vasodilatation in hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;328:982-990.
15. Ulker S, McMaster D, McKeown PP, et al. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res* 2003;59:488-500.
 16. Cacanyiova S, Berenyiova A, Kristek F, et al. The adaptive role of nitric oxide and hydrogen sulphide in vasoactive responses of thoracic aorta is triggered already in young spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol* 2016;67:501-512.
 17. Chien SHJ, Lin KM, Kuo HCH, et al. Two different approaches to restore renal nitric oxide and prevent hypertension in young spontaneously hypertensive rats: L-citrulline and nitrate. *Translational Res* 2014;163:43-52.
 18. Tain YL, Huang TL. Restoration of Asymmetric Dimethylarginine–Nitric Oxide Balance to Prevent the Development of Hypertension. *Int J Mol Sci* 2014;15:11773-11782.
 19. Cheng MC, Wu TH, Huang LT, et al. Renoprotective effects of melatonin in young spontaneously hypertensive rats with L-NAME. *Pediatr Neonatol* 2014;55:189-195.
 20. Kristek F, Faberova V, Varga I. Long-term effect of molsidomine and pentaerythrityl tetranitrate on cardiovascular system of spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res* 2003;52:709-717.
 21. Dovinova I, Cacanyiova S, Faberova V, et al. The effect of an NO donor, pentaerythrityl tetranitrate, on biochemical, functional, and morphological attributes of cardiovascular system of spontaneously hypertensive rats. *Gen Physiol Biophys* 2009;28:86-93.
 22. Pechanova O, Bernatova I, Babal P, et al. Red wine polyphenols prevent cardiovascular alterations in L-NAME-induced hypertension. *J Hypertens* 2004;22:1551-1559.
 23. AL-Zobaidy MJ, Craig J, Martin W. Differential sensitivity of basal and acetylcholine-induced activity of nitric oxide to blockade by asymmetric dimethylarginine in the rat aorta. *Br J Pharmacol* 2010;160:1476–1483.